

# Characterization of anticoagulant functions of protein S

Citation for published version (APA):

Maurissen, L. F. A. (2009). *Characterization of anticoagulant functions of protein S*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20090218lm>

## Document status and date:

Published: 01/01/2009

## DOI:

[10.26481/dis.20090218lm](https://doi.org/10.26481/dis.20090218lm)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## SUMMARY

Blood coagulation also called haemostasis proceeds via a complex process which is initiated when the blood vessel wall is damaged and tissue factor (TF) is exposed to the flowing blood. TF exposure triggers the coagulation cascade which finally results in the formation of thrombin, the conversion of fibrinogen into fibrin and the formation of a blood clot. Under normal conditions, no coagulation occurs. *In vivo* the coagulation process is regulated by circulating anticoagulant proteins that prevent excessive clot formation and a limited clot formation to the site of vascular injury.

One of these anticoagulant proteins is protein S. Protein S is a vitamin K dependent protein which circulates free (40%) and bound to C4BP (60%) in plasma. Protein S expresses cofactor activity for APC by enhancing the APC-catalyzed proteolysis at R<sup>306</sup> in factor Va. It is generally accepted that only free protein S is active, and that complex formation with C4b-binding protein (C4BP) inhibits the APC-cofactor activity of protein S. However, in chapter 2 we show that the protein S-C4BP complex expresses APC-cofactor activity, and stimulates APC-catalyzed cleavage at R<sup>306</sup> more than 10-fold, but inhibits cleavage of the peptide bond at R<sup>506</sup> by APC 3- to 4-fold. In comparison, protein S stimulates APC-catalyzed cleavage at R<sup>306</sup> ~20-fold, and has no or a minor stimulatory effect on the cleavage at R<sup>506</sup>. The overall effect of the protein S-C4BP complex on the inactivation of factor Va by APC is ~7-fold less than that of free protein S. This difference is not caused by a reduced APC-cofactor activity of the protein S-C4BP complex in APC-catalyzed cleavage at R<sup>306</sup>, but by inhibition of APC-mediated proteolysis at R<sup>506</sup> of factor Va. These observations are of particular interest for carriers of the factor V<sub>Leiden</sub> mutation (R<sup>506</sup>Q), as protein S-C4BP effectively enhances APC-catalyzed factor Va (R<sup>306</sup>) inactivation in plasma containing factor V<sub>Leiden</sub> (**Chapter 2**).

Protein S also expresses anticoagulant activity in the absence of APC (APC-independent activity). Recently, our laboratory reported that protein S stimulates the down-regulation of thrombin formation by full length TFPI i.e. acts as a cofactor of TFPI. We have developed two functional test for the determination of activity of the TPFI/protein S system in plasma (Chapter 3). The activity of the TFPI/protein S system in plasma was measured by determining thrombin generation in the absence and presence of neutralizing antibodies against protein S or TFPI. In both assays calibrated automated thrombography (CAT) was used to measure thrombin generation curves. The assay performance was first examined in plasma samples from 85 normal individuals collected at the university Maastricht. The ratio of thrombin peaks determined in the absence and presence of anti-protein S antibodies (protein

S-ratio) which was 0.5 in normal pooled plasma is a measure of the TFPI-cofactor activity of protein S. The ratio of the thrombin peaks determined in plasma which did or did not contain antibodies directed against TFPI is a measure for the efficacy via which the TFPI/protein S system down-regulates thrombin generation. The TFPI-ratio of normal plasma was around 0.25 which means that thrombin generation in plasma is reduced 75% due to the TFPI/protein S system. Protein S- and TFPI-ratios were also measured in 35 members of protein S deficient families obtained from Italy. Both ratios were significantly higher in patients who were heterozygous for type-I protein S deficiency than in their non-affected family members. The protein S- and TFPI-ratios correlated well with full-length TFPI levels determined by a newly developed ELISA and only correlated with protein S levels in the protein S-deficient individuals. Impairment of the TFPI/protein S system might contribute to an increased risk on venous thrombosis in these protein S-deficient individuals (**Chapter 3**).

The cofactor activity of protein S for APC and TFPI was also investigated in a much larger population of heterozygous protein S-deficient patients (**Chapter 4**). Epidemiological, genetic and functional studies were performed in protein S-deficient families in order to evaluate the thrombosis risk associated with type I and type III protein S deficiencies. Type I protein S deficiency is characterized by low total and low free antigen levels and type III deficient individuals have normal total and low free antigen levels of protein S. Kaplan-Meier analysis in 242 individuals belonging to 30 families showed that the exposure of type I and III protein S deficient individuals to thrombosis is similar. From the population used for Kaplan-Meier analysis, 23 families (132 individuals) were further characterized to explain this finding. In these families 11 *PROS1* mutations (3 novel) were identified. Thrombin generation-based assays that enable quantification of the APC- and TFPI-cofactor activities of protein S show that the hypercoagulable states in plasma from type I and III deficient individuals are almost the same. Apparently, the advantage conferred to type III deficient individuals by their higher protein S and TFPI levels was abolished by their older age and higher prothrombin levels. On the basis of the Kaplan-Meier analysis and the functional studies in plasma we conclude that hereditary type I and type III protein S deficiencies are associated with similar risks of venous thrombosis.

We studied the effect of oral contraceptive (OC) use on the down-regulation of thrombin generation by the TFPI and the protein C pathway (**Chapter 5**). We determined the plasma levels of full length TFPI and total and free protein S in 6 men, 12 women not using OC, 17 women using second and 19 women using third generation OC. The levels of these proteins were correlated with the outcome of functional tests that quantify the TFPI- and APC-cofactor

activities of protein S. Compared with women who were not using OC, women using second generation OC had significantly lower TFPI-cofactor activities of protein S and higher APC-resistance ratios despite the fact that they had similar protein S levels. This difference is caused by differences in the plasma level of full length TFPI, which is significantly lower in second generation pill users than in non-users. Women using third generation oral contraceptives had even lower TFPI-cofactor activities of protein S and higher APC-resistance ratios than second generation OC users. This difference appeared to be mainly caused by a further decrease in full length TFPI levels and a decrease in protein S level in third generation OC users. These observations indicate that the anticoagulant TFPI/protein S pathway is impaired in second generation OC users due to a decrease in full length TFPI levels and in third generation OC users due to decreased protein S and TFPI levels. In addition, the lower full length TFPI levels also cause an increase in APC-resistance (**Chapter 5**).

## SAMENVATTING

De bloedstolling, ook wel hemostase genoemd, is een complex proces dat aanvangt wanneer de vaatwand wordt beschadigd en weefselfactor wordt blootgesteld aan bloed. De blootstelling van weefselfactor brengt het mechanisme van de bloedstolling op gang dat uiteindelijk uitmondt in de vorming van trombine, de omzetting van fibrinogeen in fibrine en de vorming van een bloedstolsel. In normale omstandigheden vindt geen stolling plaats. *In vivo* wordt het stollingsproces gereguleerd door antistollingseiwitten die in de bloedsomloop circuleren. Zij verhinderen de vorming van overdreven bloedstolsel en beperken dit bloedstolsel tot de plaats waar het letsel in de vaatwand zich heeft voorgedaan.

Een van deze antistollingseiwitten is proteïne S. Protein S is een vitamine K-afhankelijk eiwit dat zowel vrij circuleert (40%) als gebonden is aan C4BP (C4b-bindingsproteïne) (60%) in plasma. Protein S is een cofactor voor APC (geactiveerd protein C) en versnelt hierbij de knip na R306 in factor Va. Algemeen wordt aangenomen dat alleen vrij protein S actief is als cofactor, en dat protein S in complex met C4BP geen cofactor activiteit vertoont voor APC. In dit proefschrift tonen we evenwel aan dat het protein S-C4BP complex wel APC-cofactor activiteit vertoont. Enerzijds wordt de APC gekatalyseerde knip na R306 vertienvoudigd, doch anderzijds wordt de knip na R506 met 3 tot 4 maal verminderd. Protein S daarentegen stimuleert APC gekatalyseerde knip na op positie R306 20 maal, en de knip na R506 wordt niet of nauwelijks gestimuleerd. Het globaal effect van het protein S-C4BP complex op de inactivering van factor Va door APC bedraagt 7 maal minder dan dat van vrij protein S. Dit verschil wordt niet veroorzaakt door een gereduceerde APC-cofactor activiteit van het proteïne S-C4BP complex (APC gekatalyseerde knip op positie R306), doch door remming op de knip na R506 van factor door APC. Deze vaststellingen zijn van bijzonder belang voor dragers van de factor V<sub>Leiden</sub> mutatie (positie R506Q), omwille van het feit dat protein S-C4BP complex de inactivering van factor Va (alleen R306) door APC in plasma dat factor V<sub>Leiden</sub> bevat, daadwerkelijk doet toenemen (**Hoofdstuk 2**).

Protein S vertoont tevens een antistollende activiteit in afwezigheid van APC (APC onafhankelijke activiteit). Ons laboratorium toonde recent aan dat protein S de trombinevorming doet afnemen in aanwezigheid van TFPI, en zich bijgevolg gedraagt als een cofactor van TFPI. In dit proefschrift beschrijven we twee functionele testen voor het bepalen van de antistollingsactiviteit van het TFPI/protein S systeem in plasma (**Hoofdstuk 3**). De antistollingsactiviteit van het TFPI/protein S systeem in plasma wordt bepaald door de trombinevorming in aan- en afwezigheid van neutraliserende antilichamen tegen protein S of

TFPI. In beide testen werd gebruikt gemaakt van gecalibreerde geautomatiseerde trombografie (CAT) om de trombinevorming te meten, waarbij een typische trombinecurve bekomen werd. Deze test werd eerst uitgevoerd in plasma van 85 normale individuen die werden verzameld aan de universiteit van Maastricht. De verhouding van de pieken van de trombinecurve die werden gemeten in aan- en afwezigheid van anti-protein S antilichamen (protein S-ratio) en die 0.5 bedroeg in gepoold normal plasma, staat in verhouding tot de TFPI cofactor activiteit van protein S. De TFPI-ratio van normaal plasma bedroeg ongeveer 0.25, hetgeen betekent dat de trombinevorming in plasma wordt gereduceerd met 75% als gevolg van het TFPI/protein S antistollingssysteem. De protein S- en TFPI-ratio's werden ook gemeten bij 35 leden van protein S deficiënte families afkomstig uit Italië. Beide ratio's waren aanzienlijk hoger bij patiënten die heterozygoot waren voor type I protein S deficiëntie dan bij hun niet-deficiënte familieleden. De protein S- en TFPI- ratio's stonden duidelijk in verhouding tot de hoeveelheid TFPI in plasma zoals bepaald door middel van een nieuw ontwikkelde ELISA. De protein S-ratio stond alleen in verhouding tot de hoeveelheid protein S in plasma bij de protein S deficiënte individuen. Een verlaagde activiteit van het TFPI/protein S antistollingssysteem zou kunnen bijdragen tot een verhoogd risico op veneuze trombose bij deze protein S-deficiënte individuen (**Hoofdstuk 3**).

De cofactor activiteit van protein S voor APC en TFPI werd ook onderzocht bij een grotere populatie heterozygote proteïne S deficiënte patiënten (**Hoofdstuk 4**). Epidemiologische, genetische en functionele studies werden uitgevoerd in plasma van protein S deficiënte families met het oog op het bepalen van het risico op trombose bij type I en type III protein S deficiënties. Type I protein S deficiëntie wordt gekarakteriseerd door een laag totaal en een lage hoeveelheid vrij protein S en type III deficiënte individuen hebben een normaal totaal en een lage hoeveelheid vrij protein S in plasma. De Kaplan-Meier test bij 242 individuen die deel uitmaakten van 30 families toonde aan dat de kans voor trombose voor type I en type III protein S deficiënte individuen gelijklopend is. Van deze Kaplan-Meier test, werden 23 families (132 individuen) verder onderzocht teneinde deze vaststelling te verklaren. Bij deze families werden 11 *PROS1* mutaties in het gen van protein S geïdentificeerd. Testen gebaseerd op trombinevorming die de bepaling van de cofactor activiteit van de protein S voor APC en TFPI mogelijk maken, tonen aan dat de verhoogde kans op stolling in plasma voor type I en type III deficiënte individuen bijna dezelfde is. Alhoewel type III deficiënte individuen beschikten over een hogere hoeveelheid protein S en TFPI in plasma, leek dit te worden tenietgedaan door hun hogere leeftijd en hogere hoeveelheid protrombine in plasma. Op basis van de Kaplan-Meier analyse en de functionele onderzoeken in plasma

concluderen we dat type I en type III protein S deficiëntie gepaard gaan met gelijkaardige risico's op veneuze trombose.

Tenslotte bestudeerden we het effect van het gebruik van de anticonceptiepil op verminderde cofactor activiteit van protein S voor TFPI en APC door het meten van trombinevorming (**Hoofdstuk 5**). We bepaalden de hoeveelheid TFPI, totaal en vrij protein S in plasma van 6 mannen, 12 vrouwen die geen anticonceptiepil gebruikten, 17 vrouwen die een anticonceptiepil van de tweede generatie gebruikten en 19 vrouwen die een anticonceptiepil van de derde generatie gebruikten. De hoeveelheden TFPI en protein S in plasma vertoonden een verband met het resultaat van functionele testen die de TFPI en APC cofactor activiteit van protein S bepalen. Ten opzichte van vrouwen die geen anticonceptiepil gebruikten, hadden vrouwen die een anticonceptiepil van de tweede generatie gebruikten, een beduidend lagere TFPI en APC cofactor activiteit van protein S, ondanks het feit dat zij een gelijkaardige hoeveelheid protein S in plasma hadden. Dit verschil wordt veroorzaakt door verschillen in de hoeveelheid TFPI in plasma, dat aanzienlijk lager is bij gebruiksters van een tweede generatie anticonceptiepil, dan bij niet-gebruiksters. Vrouwen die een anticonceptiepil van de derde generatie gebruikten hadden nog lagere TFPI en APC cofactor activiteit van protein S dan gebruiksters van een anticonceptiepil van de tweede generatie. Dit verschil leek voornamelijk veroorzaakt te worden door een verdere afname van TFPI en protein S niveau in plasma van gebruiksters van een derde generatie anticonceptiepil. Deze vaststellingen tonen aan dat de antistollingsactiviteit van het TFPI/protein S systeem nadelig wordt beïnvloed door het gebruik van een tweede generatie anticonceptiepil als gevolg van een afname TFPI en door het gebruik van een derde generatie anticonceptiepil als gevolg van een daling van de protein S en TFPI in plasma. Daarenboven veroorzaken de lagere hoeveelheden TFPI in plasma tevens een daling van de antistollingsactiviteit van APC (**hoofdstuk 5**).